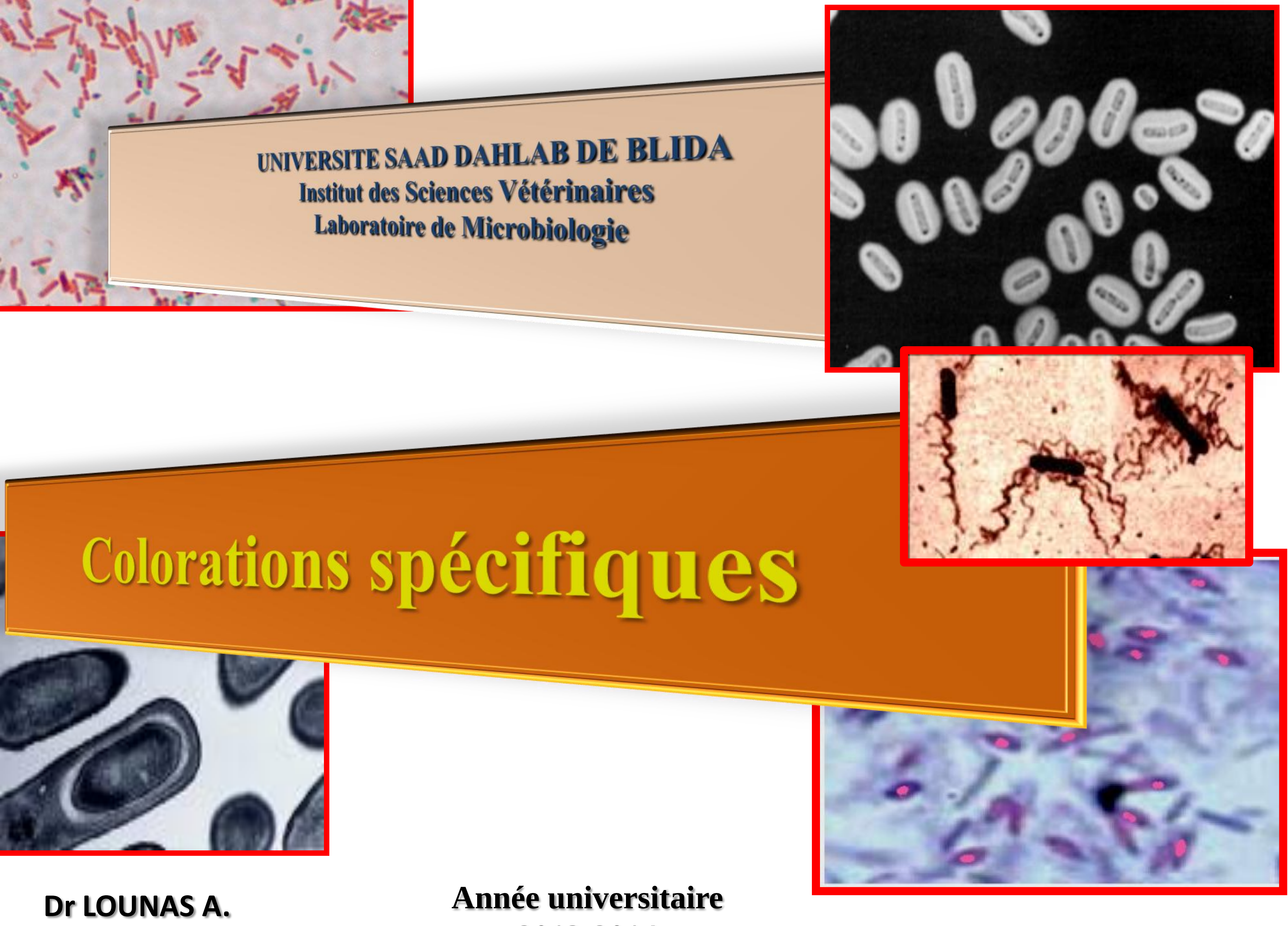


Dr LOUNAS A.

Année universitaire
2013-2014

Colorations spécifiques

1
- Coloration de la capsule

2
- Coloration du flagelle

3
- Coloration de la spore

Capsule

✓. **Structure facultative**

✓**. Couche gélatino-muqueuse : chez certains bactéries (streptococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Haemophilus…)**

✓**. Nature biochimique :**

- …polysaccharides :
- …polypeptides :
- …mixte :

✓. **Fonctions :**

- … Protection
- … Energétique
- … Antigénique (antigène K)

Recherche de la capsule, pourquoi?

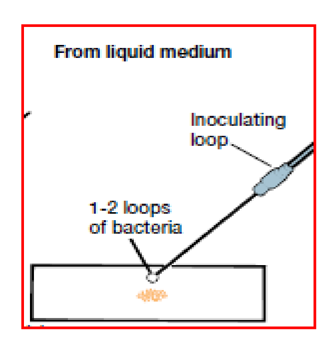
. Critère d'identification :

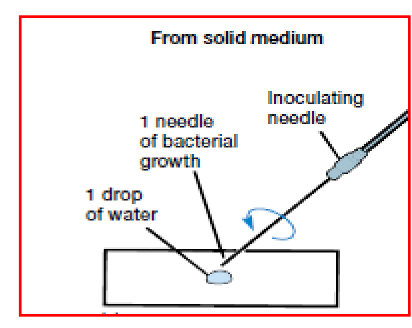
I… Bactéries capsulées virulentes : formes lisses
II… Bactéries non capsulées avirulentes : formes rugueuses

Etat frais à l’encre de chine

I

- Goutte de suspension bactérienne
- Goutte d’eau physiologique + une partie de colonie bactérienne



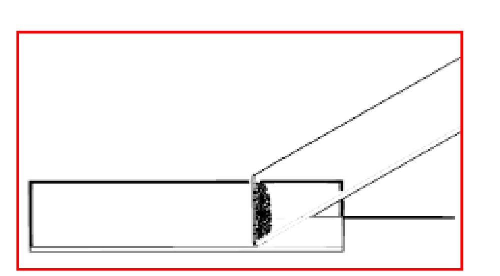




- Goutte d’encre de chine : contrastant

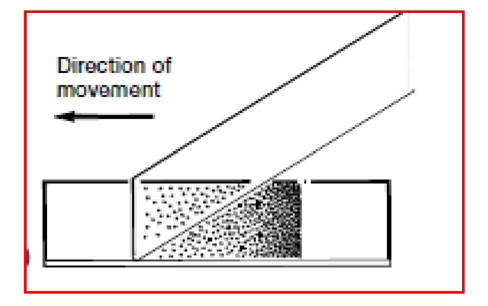


- Recouvrir d’une lamelle





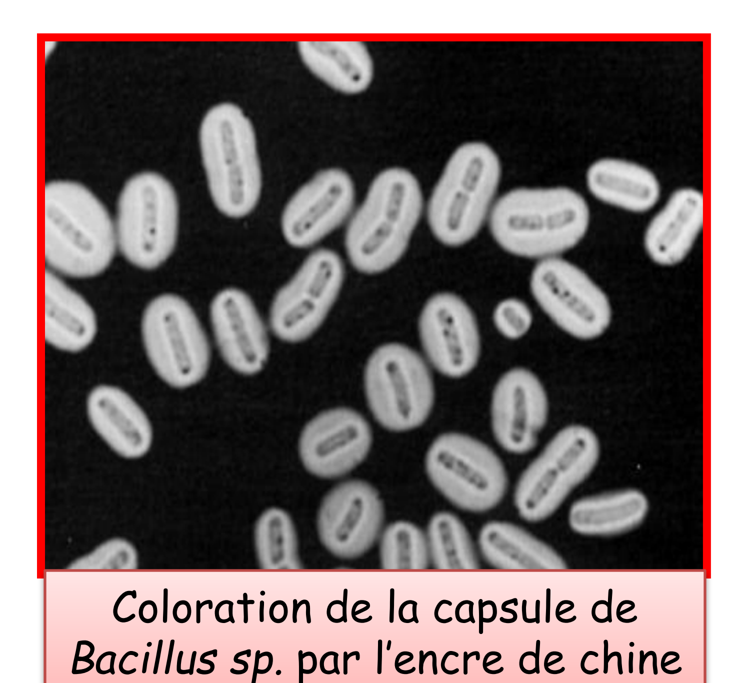
- Examiner à l’objectif × 40



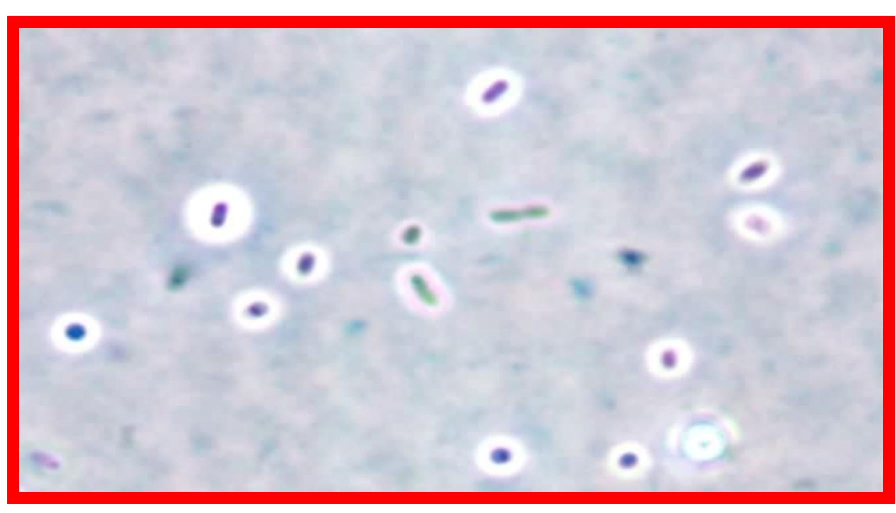
Observation microscopique

- ✓Capsule : halo clair autour des corps bactériens
- ✓Coloration négative



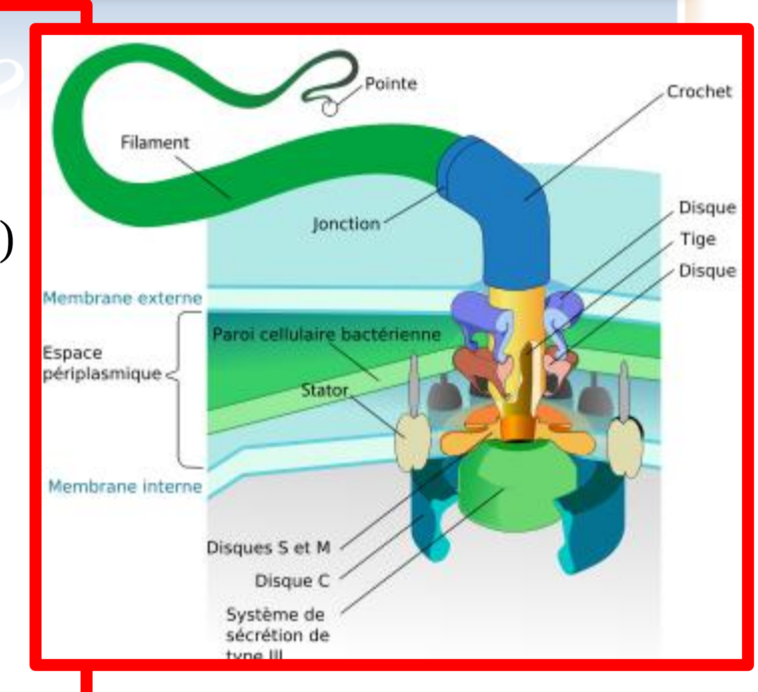


Coloration de la capsule de *Bacillus sp.* par l'encre de chine (×1000)



Flagelles

- ✓. **Elément facultatif : mobilité des bactéries**
- ✓. **Composition : nature protéique**
- ✓. **Structure : trois parties**
    - •Filament (flagelline) : rôle antigénique (antigène H)
    - •crochet
    - •corps basal
- ✓. **Types flagellaires :**
    - •Pas de flagelle : immobilité
    - •Flagelle : mobilité
- ✓. **Implantation variable :**
    - •polaire :
    - •péritriche
- ✓. **Coloration spécifique pour le visualiser sous MO**



Structure d'un flagelle

Coloration par la méthode de Rhodes

Principe : Epaississement des flagelles on utilisant

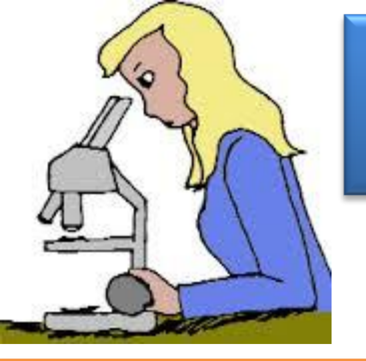
- **Un mordant :** facilite la coloration
- **Un colloide :** épaissit les flagelles et les rend visibles.



Les flagelles sont fragiles et la préparation du frottis est délicate

Technique de coloration
« Méthode de Rhodes »

1. **Préparation du frottis**
2. **Coloration du frottis :**
   - Mordant de Rhodes : 3 minutes
   - Nitrate d'argent ammoniacale + chauffage jusqu'à ébullition : laisser agir 3 à 5 minutes
3. **Observation microscopique :**
   - Objectif à immersion
   - On apprécie :
     - ✓ Présence ou absence des flagelles
     - ✓ Types flagellaires



Observation microscopique

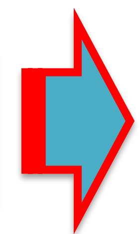
- Corps bactériens presque **noirs**
- Flagelles sont teintés en **brun** plus ou moins foncé

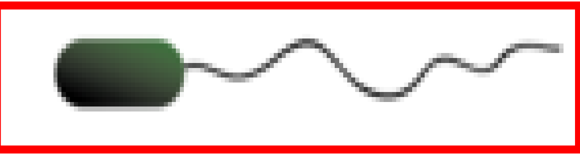
1

Absence de flagelle(s)

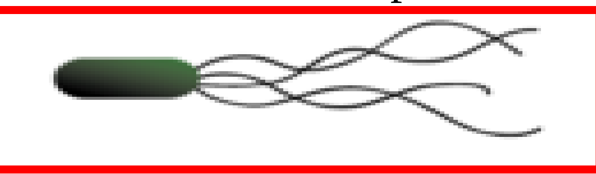
2

Présence de flagelle (s)

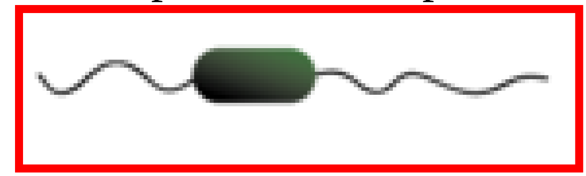




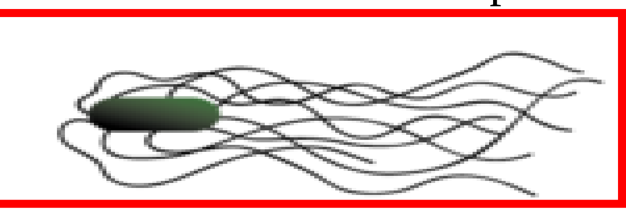
Ciliature monotriche (droit)
ex : Vibrio sp.



Ciliature lophotriche (droit+culbute)
ex : plésiomonas sp.

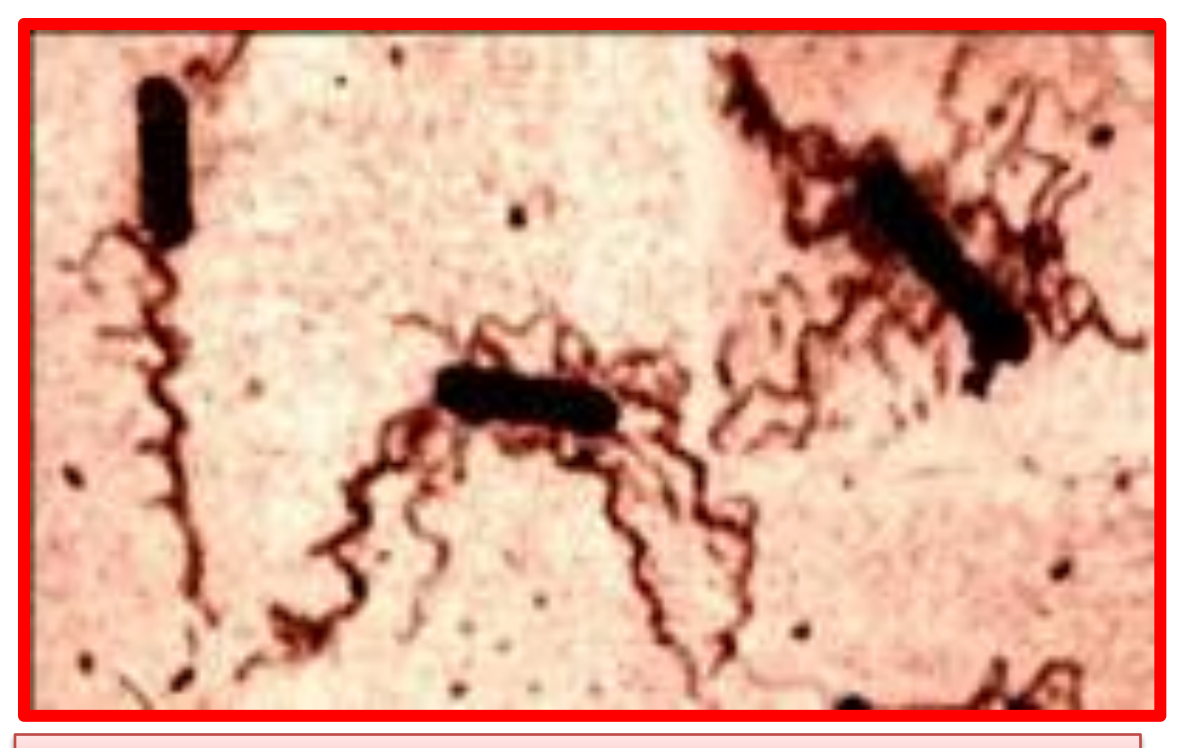


Ciliature amphitriche (zigzag)
ex : Helicobacter sp.



Ciliature péritriche (court trajets avec changements fréquents de direction) ex : E.Coli.

Observation microscopique



Coloration de Rhodes & Fontana-Tribondeau



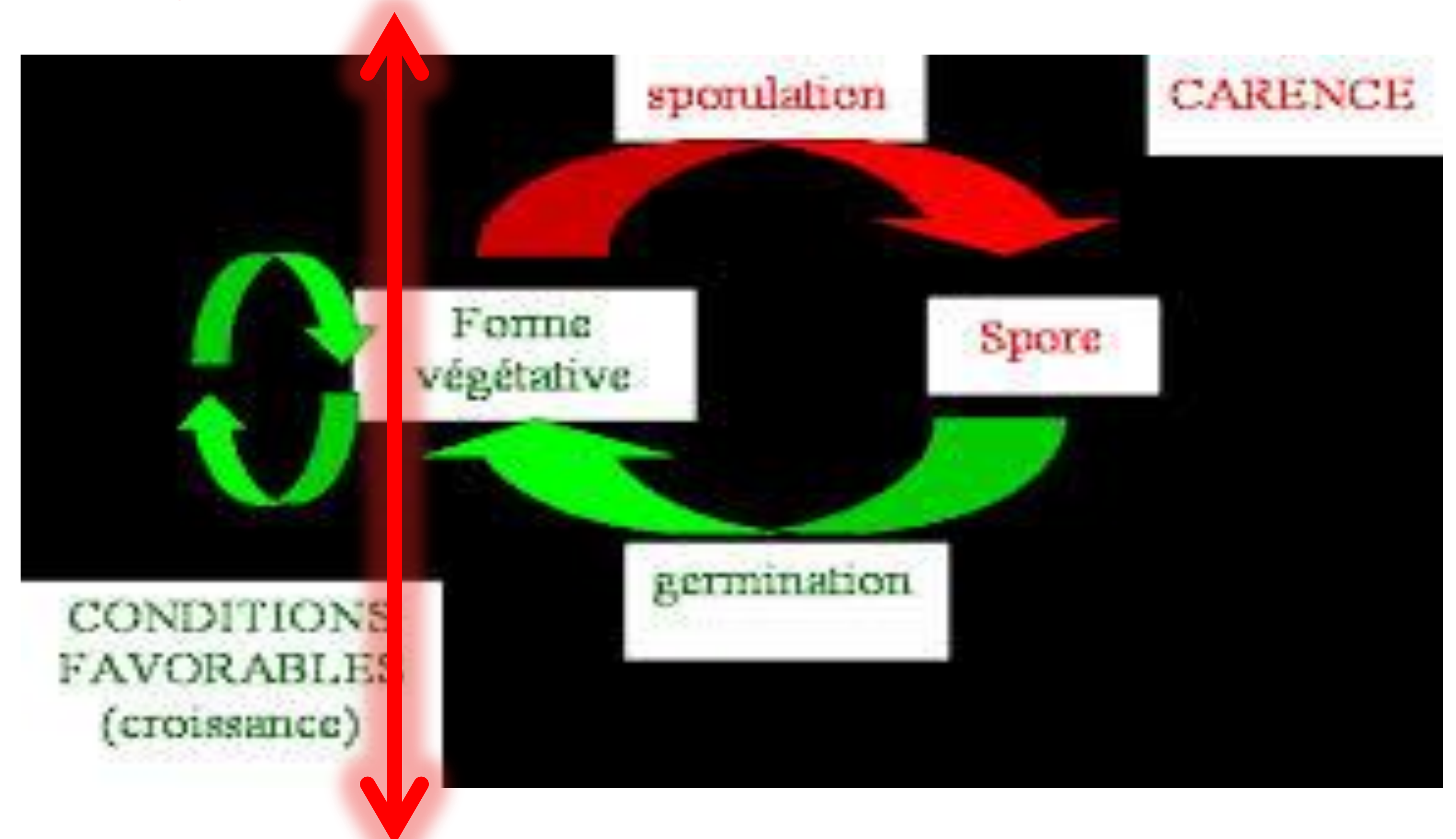
Coloration de Leifson d'une souche de *Vibrio*

Coloration des spores

Endospores : Conditions de vie défavorables aux bactéries??? = **Sporulation**

Sporulation : Certaines bactéries Gram +.

- Bacillus
- Clostridium



Spore ?

- **Dormante**
- **Structure non reproductive**
- **Forme de résistance d’une bactérie aux :**
  - UV,
  - Dessiccation,
  - Haute température,
  - Froid, congélation,
  - Désinfectants

Mise en évidence des spores

1

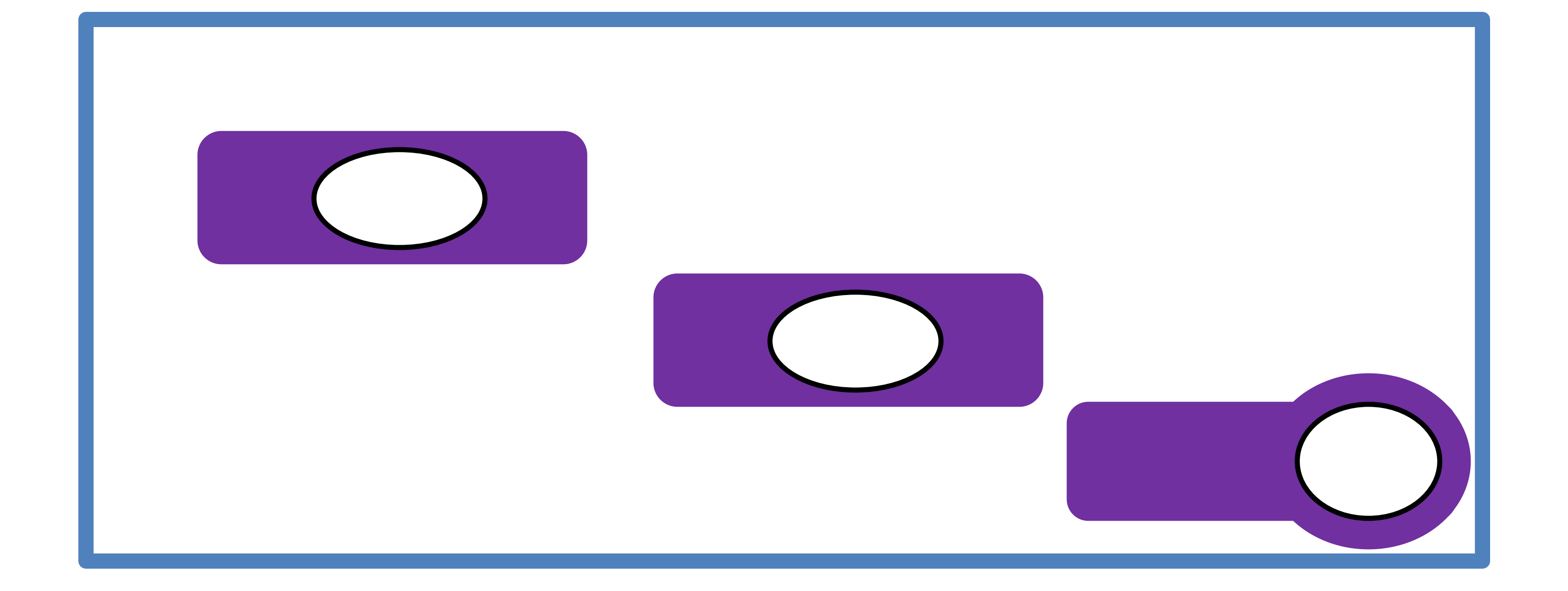
- A l’état frais
- Spores très réfringentes

2

- Coloration de Gram
- Spore incolore à l’intérieur des bacilles

3

- Techniques de coloration spécifiques
- Ex : coloration de Moeller, coloration au Vert Malachite



Coloration de Gram = Coloration négative : cytoplasme violet + spore incolore

Coloration de Moeller

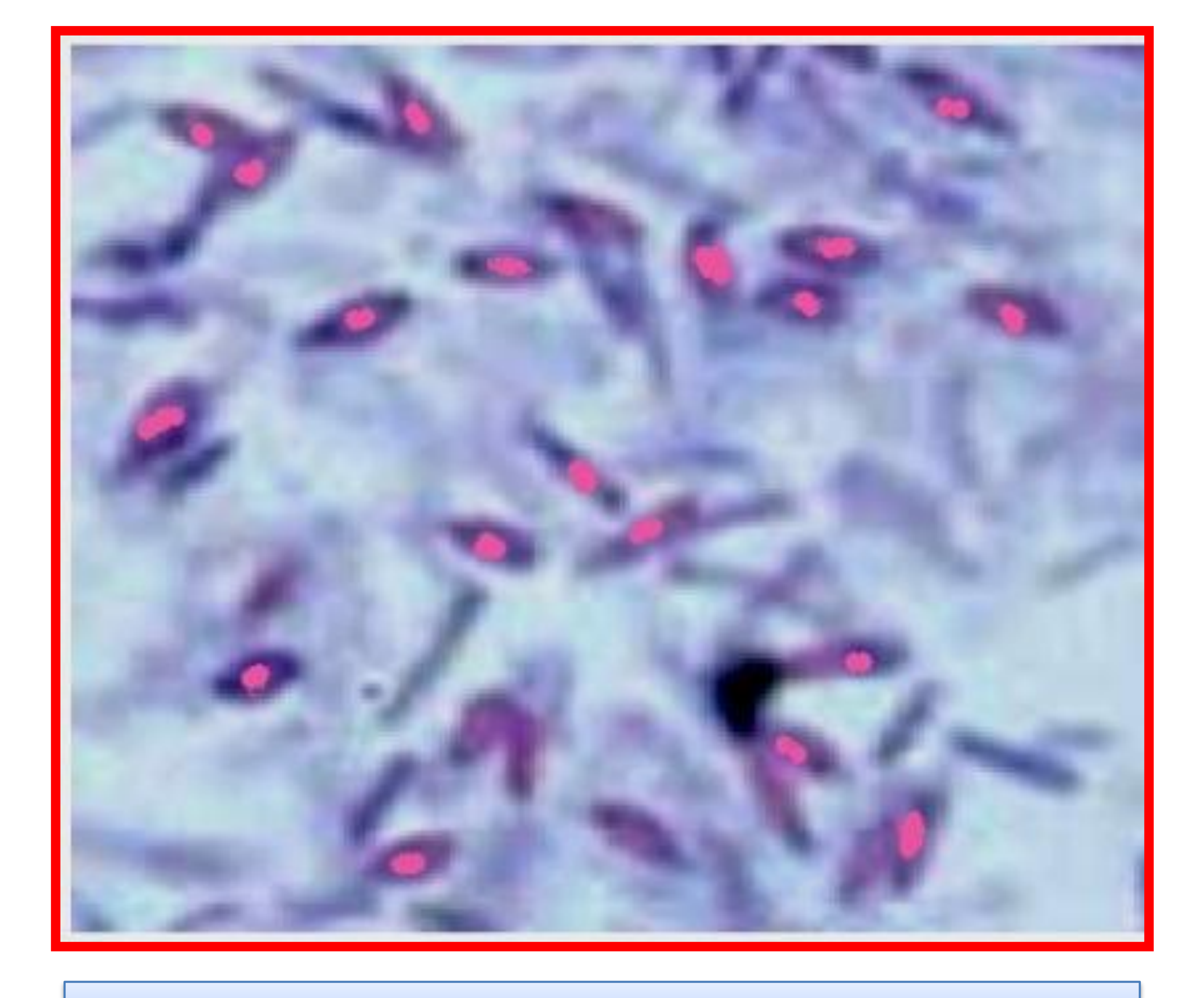
I. Préparation, séchage et fixation du frottis sur la lame

II. Coloration du frottis :

- Recouvrir de L'**acide chromique à 5%** : 5 à 10 Min
- Colorer par la **fuchsine phéniquée** concentré à chaud : 10 Min.
- Verser quelques gouttes de **chlorhydrate d'aniline (2%)** puis aussitôt de l'**éthanol** Mélanger en ne laissant agir que quelques secondes
- Recolorer au **bleu de méthylène** phéniqué : 1 Min

III. Observation au microscope optique :

- Objectif à immersion
- Spores apparaissent **roses** dans des corps bactériens **bleus**



Coloration de Moeller : souche de clostridium

Coloration au Vert Malachite

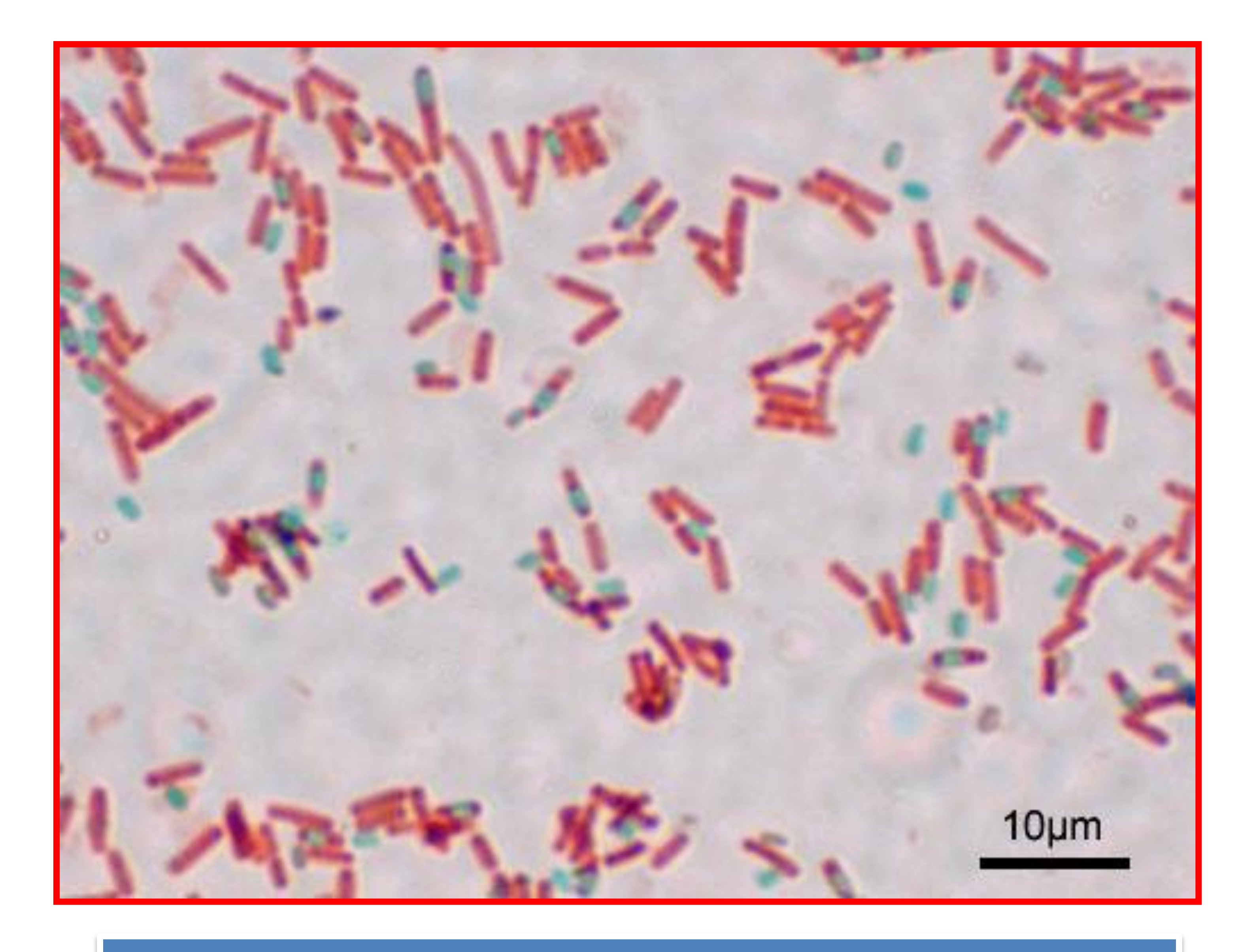
I. Préparation, séchage et fixation du frottis sur la lame

II. Coloration du frottis :

- Coloration par une solution aqueuse de **vert malachite** à 10% : 45 Min
- Recoloration avec la **safranine** à 0.5% : 30 sec

III. Observation au microscope optique :

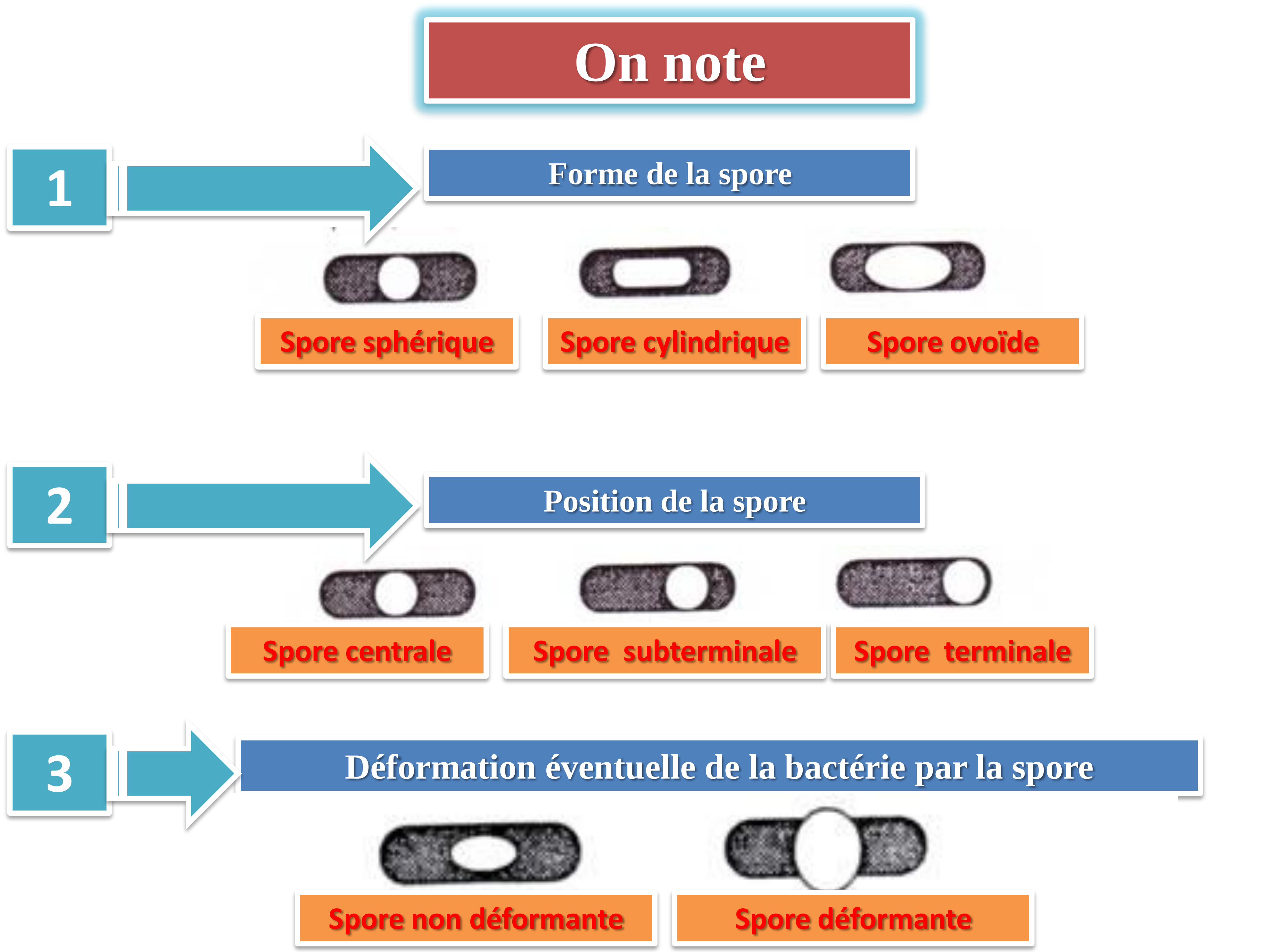
- Objectif à immersion
- **Spores** sont colorées en **vert** et les cellules bactériennes en **rouge-rosé**



Coloration au Vert Malachite



***Bacillus subtilis* (ME)**


On note
1
Forme de la spore
Spore sphérique
Spore cylindrique
Spore ovoïde
2
Position de la spore
Spore centrale
Spore subterminale
Spore terminale
3
Déformation éventuelle de la bactérie par la spore
Spore non déformante
Spore déformante